

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-503687

(P2002-503687A)

(43) 公表日 平成14年2月5日 (2002.2.5)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テマコード* (参考)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 45/00

4 C 0 7 6

9/127

9/127

4 C 0 8 4

31/7105

31/7105

4 C 0 8 6

31/711

31/711

4 C 0 8 7

35/76

35/76

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-532105(P2000-532105)

(86) (22) 出願日 平成11年2月23日 (1999.2.23)

(85) 翻訳文提出日 平成12年8月23日 (2000.8.23)

(86) 国際出願番号 P C T / E P 9 9 / 0 1 1 5 3

(87) 国際公開番号 W O 9 9 / 4 2 0 8 8

(87) 国際公開日 平成11年8月26日 (1999.8.26)

(31) 優先権主張番号 1 9 8 0 7 4 2 6 . 3

(32) 優先日 平成10年2月23日 (1998.2.23)

(33) 優先権主張国 ドイツ (D E)

(71) 出願人 オトゲネ アクチェン ゲゼルシャフト
ドイツ連邦国、テュービンゲン D-
72070、フォル デム クロウツベルグ
17

(72) 発明者 ロエヴェンハイム ヒューベルト
ドイツ連邦国、テュービンゲン D-
72076、フィリップ-フォン-ヘッカー-
シュトラッセ 1

(74) 代理人 弁理士 塩澤 寿夫 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 内耳の疾患又は機能障害の治療方法

(57) 【要約】

内耳の知覚細胞の損傷又は破壊と関連する内耳の疾患又は機能障害の治療方法において、知覚細胞を再生するために、使用は、内耳中に存在する少なくとも1つの細胞周期阻害剤の阻害作用を少なくとも部分的に阻害し、又は排除する少なくとも1つの活性成分から成る。この方法において、内耳の知覚細胞は、支持細胞の増殖を刺激することによって好ましくは再生される。細胞周期阻害剤として、使用は特にサイクリン依存性キナーゼ阻害剤 p 2 7^{Kip1} のようなサイクリン依存性キナーゼ阻害剤からなり得る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 内耳の知覚細胞の再生のために、内耳中に存在する少なくとも1つの細胞周期阻害剤の阻害作用が、活性成分によって少なくとも部分的に阻害され、又は排除されることを特徴とする内耳の知覚細胞の損傷又は破壊に関連した内耳の疾患又は機能障害の治療方法。

【請求項2】 内耳の知覚細胞の損傷又は破壊に関連した内耳の疾患又は機能障害の治療のための、内耳中に存在する細胞周期阻害剤の作用を阻害し、又は排除することができる活性成分の使用。

【請求項3】 内耳の知覚細胞の損傷又は破壊に関連した内耳の疾患又は機能障害の治療のための薬学的組成物又は薬剤の調製のための、内耳中に存在する細胞周期阻害剤の作用を阻害し、又は排除することができる活性成分の使用。

【請求項4】 内耳の支持細胞の増殖を刺激することによって内耳の知覚細胞の再生が起こることを特徴とする前述の請求項の1項に記載の方法又は使用。

【請求項5】 内耳の知覚細胞が毛髪知覚細胞であることを特徴とする前述の請求項の1項に記載の方法又は使用。

【請求項6】 細胞周期阻害剤がサイクリン依存性キナーゼ阻害剤であることを特徴とする前述の請求項の1項に記載の方法又は使用。

【請求項7】 サイクリン依存性キナーゼ阻害剤が、サイクリン依存性キナーゼ $p27^{Kip1}$ であることを特徴とする請求項6に記載の方法又は使用。

【請求項8】 内耳の疾患又は機能障害が感音難聴であることを特徴とする前述の請求項の1項に記載の方法又は使用。

【請求項9】 活性成分が少なくとも1つのペプチド又は少なくとも1つの蛋白質であることを特徴とする前述の請求項の1項に記載の方法又は使用。

【請求項10】 活性成分が少なくとも1つの核酸分子、特に組換えられた核酸分子であることを特徴とする前述の請求項の1項に記載の方法又は使用。

【請求項11】 核酸分子が請求項9に記載のペプチド又は蛋白質をコードすることを特徴とする請求項10に記載の方法又は使用。

【請求項12】 核酸分子がDNA分子であることを特徴とする請求項10又は11に記載の方法又は使用。

【請求項13】 核酸分子がcDNA分子であることを特徴とする請求項12に記載の方法又は使用。

【請求項14】 核酸分子がRNA分子であることを特徴とする請求項10又は11に記載の方法又は使用。

【請求項15】 活性成分がベクターの形態であり、かつ好ましくは前記ベクターが請求項10～14の1項に記載の核酸分子を保持することを特徴とする前述の請求項の1項に記載の方法又は使用。

【請求項16】 ベクターがウイルスベクターであることを特徴とする請求項15に記載の方法又は使用。

【請求項17】 ウイルスが、レトロウイルス、アデノウイルス又はアデノ結合ウイルスであることを特徴とする請求項16に記載の方法又は使用。

【請求項18】 ベクターが非ウイルスベクターであることを特徴とする請求項15に記載の方法又は使用。

【請求項19】 リポソーム又はリポプレックスに内包された核酸分子であることを特徴とする請求項10～14の1項に記載の方法又は使用。

【請求項20】 活性成分が治療効果のある活性量で使用されることを特徴とする前述の請求項の1項に記載の方法又は使用。

【請求項21】 活性成分が局所適用のためのものであることを特徴とする前述の請求項の1項に記載の方法又は使用。

【請求項22】 内耳中に存在する細胞周期阻害剤の作用を少なくとも部分的に阻害し又は排除する位置にあることを特徴とする内耳の知覚細胞、好ましくは内耳の毛髪知覚細胞の再生のための活性成分。

【請求項23】 細胞周期阻害剤がサイクリン依存性キナーゼ阻害剤、好ましくはサイクリン依存性キナーゼ阻害剤p27^{Kip1}であることを特徴とする請求項22に記載の活性成分。

【請求項24】 少なくとも1つのペプチド又は少なくとも1つの蛋白質であることを特徴とする請求項22又は23に記載の活性成分。

【請求項25】 少なくとも1つの核酸分子、好ましくは組換えられた核酸分子であることを特徴とする請求項22又は23に記載の活性成分。

【請求項26】 核酸分子がDNA分子、cDNA分子又はRNA分子であることを特徴とする請求項25に記載の活性成分。

【請求項27】 活性成分が、請求項15～19の少なくとも1つの特徴によって好ましくは特徴付けられるベクター又はビヒクルの形態であることを特徴とする請求項22～26の1項に記載の活性成分。

【請求項28】 内耳中に存在する細胞周期阻害剤の作用を阻害し、又は排除することができる少なくとも1つの活性量の活性成分及び薬学的に適用可能なキャリアーを含有することを特徴とする薬学的組成物又は薬剤。

【請求項29】 活性成分が請求項23～27の1項に記載の活性成分であることを特徴とする請求項28に記載の薬学的組成物又は薬剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、まず第一に、内耳の知覚細胞の損傷又は破壊に関連する内耳の疾患又は機能障害の治療方法に関する。

【0002】

ヒト及び他の哺乳動物の内耳は、最初から遺伝的欠陥によって、又は続いて起こる外的影響によって回復できないように(irreversibly)損傷され得る。これらの外的影響は、例えば音響性外傷又は毒若しくは低酸素の影響であり得る。このような損傷は、機能的障害又は内耳にある感覚、特に聴覚の低下を引き起こし得る。これらの機能的障害の場合、聴力の減少又は喪失について調べる必要がある。ドイツではおよそ1200万人の人々が、前述の発病機構に起因すると考えられ得るいわゆる感音難聴(perceptive deafness)を患っていると見積もられている。知覚ニューロンの変性及び内耳のいわゆる血管条(stria vascularis)への損傷のほかに、聴力の部分的又は完全な喪失の原因は、特に内耳の知覚細胞の、及びその結果聴覚器官の損傷又は破壊であり得る。

【0003】

知覚細胞の損傷又は破壊に関連した内耳の疾患又は機能障害の治療方法において、ヒト及び他の哺乳動物の内耳中の高度に分化された知覚上皮中の、回復できないように損傷され、そしてそのために失われた細胞を再生することは、もはや不可能であることを心に留めておかなければならない。従って、内耳中の知覚細胞の損傷又は破壊に帰因する部分的又は完全な聴覚の喪失は、通常回復できない。この点において、内耳の知覚上皮は、壊死(necrotic)細胞が代わりの細胞の分裂及びそれらの続いて起こる成熟によって素早く代替され得る他の組織と根本的に異なる。

【0004】

例えば鳥類のような他の脊椎類において、ヒトとは異なり、内耳中の壊死知覚細胞が再生され得ることは興味深い。鳥類において、損傷後に死んだ知覚細胞は、知覚細胞の下方の上皮中に位置するいわゆる支持(supporting)細胞によって代替される。これは、支持細胞の分裂及び続いて起こる成熟によって起こり、支持

細胞から新しい支持細胞及び知覚細胞が得られる。

【0005】

トリの蝸牛(cochlea)中の知覚細胞の再生の発見は、ここ数年に渡り、トリに関して行われた研究結果を哺乳動物及びそれによって最終的にヒトへ転換させる試みをもたらした。トリの蝸牛及び哺乳動物の蝸牛は、共通する細胞生物学的な点を有するので、これはとりわけ成功が期待された。トリ蝸牛の知覚上皮及び哺乳動物蝸牛の知覚上皮はいずれも後細胞分裂性(postmitotic)である。即ち、知覚上皮中に存在する知覚細胞は、所定の胚発達期間中にのみ形成され、その後は更なる細胞分裂は通常起こらない。しかし、この共通する根本的な点は、ヒトにおいては起こらないが、トリ細胞の前庭知覚上皮において細胞分裂がその寿命の間中観察され得る現象を理解することを困難にする。

【0006】

トリにおいて、いわゆる成長因子がトリの蝸牛における増殖率の増加を生じさせ得ることが認識されたので、そのような成長因子は哺乳動物の蝸牛においても使用された。しかし、再生可能な作用を証明することはできなかった。これは、共通する根本的な細胞生物学的な点にもかかわらず、ヒト及び哺乳類の蝸牛の間には他の大きな違いが存在するはずであるという結論が引き出されることを明らかにする。これらは、哺乳動物の場合と同様に、トリの蝸牛の支持細胞は後細胞分裂性であるが、しかし細胞周期を一時的に残す(left)だけであったことであろう。対応するシグナルが現れた場合にそれらはその後細胞周期に再び入り得る。そのような支持細胞は、静止状態、即ちそれらは待機状態にあると呼ばれ得る。これに反して、哺乳動物の支持細胞は、非常に高くかつ特異的な分化(differentiation)を経ており、その結果、細胞周期を回復できなくなる。それらはその結果、最終分化されたと呼ばれることができ、そして例えばニューロンと比較される。それらはいわゆるピラー(Pillar's)又はダイター(Deiter's)細胞と呼ばれる哺乳動物の支持細胞の場合に適用され得る。トリと哺乳動物との蝸牛の間の細胞生物学的違いに対するこのような説明モデルは、得られた結果を続けて哺乳動物に移転するための、トリにおける知覚細胞の再生のより詳細な調査をもたらす。

【0007】

本発明の課題は、内耳の機能障害又は疾患の治療のための新しい出発点を見出すことである。その狙いは、哺乳動物以外の脊椎動物において得られた結果を、哺乳動物、特にヒトへ移転することよりも、哺乳動物における細胞の過程において直接作用し、そして最終的に内耳の知覚細胞の再生を引き起こす、作用機構及び対応する活性成分を利用可能にすることにある。

【0008】

この課題は、請求項1の特徴を有する方法並びに請求項2及び3の特徴を有する方法によって解決される。好ましい態様は、従属項4～21において説明される。そのため、参照として、全請求項の内容が本記載の一部に組み入れられる。

【0009】

本発明によれば、上記の様式の方法は、内耳中に存在する少なくとも1つのいわゆる細胞周期阻害剤が、結果として内耳の知覚細胞の再生を引き起こす少なくとも1つの活性成分によって部分的に阻害され、又は排除されるその阻害作用を有することを特徴とする。特許法の意味から、この方法は、内耳の知覚細胞の損傷又は破壊に関連する内耳の疾患又は機能障害の治療のために直接的に、又は内耳の知覚細胞の損傷又は破壊に関連する内耳の疾患若しくは機能障害の治療のための薬学的組成物若しくは薬剤の調製のために間接的に、内耳中に存在する細胞周期阻害剤の作用を阻害し、又は排除することができる活性成分の使用をも包含する。

【0010】

本発明の方法の結果もたらされた内耳の知覚細胞の再生は、内耳の支持細胞、即ち、知覚上皮中にも存在し、かつ通常は知覚細胞の間又は下方に位置する支持細胞の増殖の刺激を介して好ましくは行われる。内耳の支持細胞中に1つ以上の細胞周期阻害剤が存在する場合、適当な活性成分によりそれらの阻害作用を阻害し、又は排除することによって、支持細胞の分裂を開始することができ、それによって、壊死した又は死んだ知覚細胞を代替又は置換する細胞を生成させるために根本的に必要な条件がもたらされる。支持細胞の分裂の結果得られた細胞は、その後少なくとも部分的に機能的知覚細胞に成熟し得る。

【0011】

今まで言及された内耳の知覚細胞に関して、それらの上端毛髪様伸張(upper end hair-like extensions)に、いわゆるステレオシリア(stereocilia)又は小知覚毛髪を有するいわゆる毛髪知覚細胞又は短毛髪細胞が好ましくは存在する。これらの毛髪細胞は、いわゆる皮質器官(corti-organ)中の底部膜(basilar membrane)上に位置し、そしていわゆる外部又は内部毛髪細胞として、内耳中の音の変換(transduction)のための実際の受容体細胞を形成する。内部及び外部毛髪細胞の両方は、それらのより高い感度の結果として、再生、本発明の使用の特定分野を示す外部毛髪細胞の再生のために重要である。内部又は外部毛髪知覚細胞と解剖学的に特に良好に関連するそれらの支持細胞は、特に、本発明によって用いられる活性成分のために使用され得る。そのため、支持細胞としての外部毛髪知覚細胞とは別に、いわゆるハンセン細胞(Hensen's cells)並びに、外部毛髪知覚細胞の下方の、いわゆるダイター細胞及び“外部”ピラー細胞が使用され得る。従って、これらのハンセン、ダイター及び外部ピラー細胞は、外部毛髪知覚細胞に対する代替細胞として特に適している。それに対応して、支持細胞として、いわゆる内部溝細胞(inner sulcus cells)が内部毛髪知覚細胞の横及び下方に提供され、更に内部毛髪知覚細胞内で内部ピラー細胞も提供される。両者ともに内部毛髪知覚細胞に対する代替細胞として使用できる。そのため、任意に、内部又は外部毛髪細胞の再生が選択的に開始されかつ影響を受け得る。哺乳動物、特にヒトにおける聴き取り過程(hearing process)に関する関連する教本及び文献が、この関連で参照され得る。前記知覚細胞に対する損傷の場合における、感音難聴(perceptive deafness)の治療のための内耳における音の変換に関与する毛髪知覚細胞の再生は、本発明の使用の主要な分野である。

【0012】

その阻害作用が本発明によって阻害され、又は排除され得る細胞周期阻害剤は、細胞が行う細胞分裂を含む通常の細胞周期を妨げる生理学的物質、特に蛋白質と根本的に相違するものであり得る。それらは、好ましくはいわゆるサイクリン依存性キナーゼ阻害剤(CDKIs)である。生物体の創製中に、それらは、最終的に分化した細胞の発生中に発現が増大し、そしてこれにより細胞が細胞周期へ再び入ることを妨げる。これは、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤の発現増大に

よるそのような細胞の分裂可能性(dividability)の喪失をも説明し得る。細胞周期阻害剤及び特にいわゆるCIP/KIP群のサイクリン依存性キナーゼ阻害剤は、特定のタイプの細胞において選択的に発現され得る。好ましいサイクリン依存性キナーゼ阻害剤は、特にp21^{CIP1}、p27^{KIP1}及びp57^{KIP2}と呼ばれる蛋白質である。本発明によれば、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤p27^{KIP1}が好ましい。そのような阻害剤の選択的発現及びその結果得られる異なる発現形態の結果として、本発明は、特定のタイプの細胞における細胞周期に選択的に影響を与えるために使用され得る。例えば、内耳の知覚上皮における例えば支持細胞のような特定のタイプの細胞において、p27^{KIP1}は、この阻害剤を特異的に標的とする活性成分によって選択的に又は少なくともかなり大きな割合で発現される場合、その阻害作用を排除し、かつその結果支持細胞の増殖を開始し、又は刺激することができる。支持細胞の分裂の結果得られた細胞の少なくとも一部の成熟によって、知覚細胞の再生が引き起こされる。

【0013】

今までの記述から明らかなように、本発明によって、関係する内耳疾患又は機能障害は、特にいわゆる感音難聴である。これは、既述された内耳中の毛髪知覚細胞の損傷又は破壊に関連する。

【0014】

細胞周期阻害剤の阻害作用を阻害し、又は排除する、本発明において使用可能な活性成分は、直接的又は間接的に細胞内手法(intracellular manner)において通常作用する物質、即ち通常はペプチド又は蛋白質であることが好ましい。この活性成分は、阻害剤とのペプチド-ペプチド又は蛋白質-蛋白質相互作用をもたらすペプチド又は蛋白質の形態で好ましくは存在する。これは、その後阻害剤の機能の“直接的な”影響の場合であり得る。活性成分がアミノ酸配列の前述のペプチド類/蛋白質類の1つをコードする核酸分子によって構成される場合、最初にコードする核酸分子が対応する細胞内へ導入され、そして続けて(活性成分として直接的に働く)ペプチド/蛋白質分子が発現されるので、“間接的な”影響とすることができる。前記核酸分子は、特に組換えられた核酸分子であり得る。核酸分子は、基本的にはDNA分子、cDNA分子又はRNA分子であり得る。

【0015】

本発明による好ましい手法において使用可能な別の活性成分は、使用法がいわゆるアンチセンス法から成る核酸分子である。専門家に基本的に既知のこの方法において、使用法は通常、通常の（生理学的）遺伝子のRNAと相補的なRNAから成る。この相補的RNAは、アンチセンスRNAと呼ばれる。アンチセンスRNAは、遺伝子に属する蛋白質生成物の合成を妨げることができる。本発明の場合、これは、核酸分子、例えばアンチセンスRNA自身又はその転写の間にアンチセンスRNAが形成されるDNAが、細胞周期阻害剤の阻害作用を阻害し、又は排除するために生物体又は細胞内へ導入されることを意味する。この導入は、核酸分子の細胞内へのより良好な連結及び貫通のためにウイルス化合物をも保持する脂質化合物を利用して好ましくは行われる。

【0016】

上述の通り、本発明の場合の活性成分は、細胞周期阻害剤との直接的な相互作用、好ましくはペプチド-ペプチド又は蛋白質-蛋白質相互作用をもたらし得る。しかし、この活性成分は、細胞周期阻害剤自身と同様に、又は好ましくはより良好に細胞周期阻害剤の生理学的相互作用パートナーと相互作用する細胞周期阻害剤の阻害作用を間接的に阻害し、又は排除することもできる。これは、細胞周期阻害剤が、その生理学的（阻害）作用を発揮するのを妨げる。

【0017】

そのため、例えばサイクリン依存性キナーゼ阻害剤 $p27^{KIP1}$ の場合、それがサイクリン依存性キナーゼCDK2及びサイクリンAと共に蛋白質複合体を形成することが知られている。 $p27^{KIP1}$ とCDK2又はサイクリンAとの間にはペプチド-ペプチド相互作用が発生する特異点が存在する。そのため、例えば $p27^{KIP1}$ とサイクリンAとの間の非常に高い親和性の結合点及び $p27^{KIP1}$ とサイクリンAとの間、又は $p27^{KIP1}$ とCDK2との間の種々のより弱い結合点の同定が行われた。高親和性でない、又は非常に高親和性な結合／相互作用が存在する結合点の1つを抜き出す場合、選択され、又は創製され得る活性成分は、好ましくは更なるペプチド／蛋白質の形態で、特定の結合点での2つの相互作用パートナーの1つとの、少なくとも同様に高い、又は好ましくはより高い親和性の結

合／相互作用をもたらし得る。これは、生理学的相互作用パートナーのための対応する結合点が遮断されるため、標準の生理学的相互作用を阻害し、又は妨げる。

【0018】

そのため、最適化されたペプチド構造又は最適化されたアミノ酸配列は、例えば p 27^{K1P1} とサイクリン A との結合点について、しかし CDK 2 との結合点についても、この点で p 27^{K1P1} のアミノ酸配列のために創製することができ、この点でサイクリン A 又は CDK 2 の対応する配列とより良好に、即ちより高い親和性で、その後結合する。このような最適化されたペプチド構造は、例えば好ましくは 15 個までのアミノ酸を含み、そして細胞内へその後直接的に導入され、又は細胞内手法において人工的に導入された遺伝子によって好ましくは発現される。このようなペプチドの高い親和性によって、生理学的ペプチドパートナーの相互作用は、その後破壊され、そして細胞周期阻害剤の阻害作用に基づくペプチド複合体の形成が妨げられる。そのため、活性成分は、細胞周期阻害剤の阻害作用の少なくとも一部を阻害し、又は完全に排除することを保証する。本発明のこの方法の出発点の結果として、活性成分、特に細胞中の対応するアミノ酸配列を有するペプチド／蛋白質の濃度は、その作用が阻害され、又は排除されるべき細胞周期阻害剤の対応する濃度とほぼ同程度でなければならない。そのような濃度が、例えば p 27^{K1P1} ではおよそ 10 nM／リットルであり、かつ細胞当たり 1,000～10,000 個の分子に相当する場合、非常に低濃度であっても本発明の実施のために十分であり得る。遺伝子治療法を使用するそのような濃度を達成するためには、各細胞に対して、対応するアミノ酸配列をコードする DNA の単一複製のみを導入すれば十分であることもまた、重要である。更により高濃度又はより多数の DNA 複製を使用しなければならない他の方法と比較して、これは決定的な利点を表す。

【0019】

更なる態様に従って、本発明による方法は、活性成分がいわゆるベクター又はビヒクル(vehicle)の形態であり、前記ベクター又はビヒクルが少なくとも 1 つの前述の核酸分子を保持するように行うこともできる。好ましくは、それは活性

成分として働くペプチド又は蛋白質のアミノ酸配列をコードする核酸分子である。前記ベクターは、専門家に知られているような、通常のウイルス又は非ウイルスベクターであり得る。ウイルスベクターを使用する場合、レトロウイルス、アデノウイルス又はアデノ結合(adeno-associated)ウイルスを使用し得る。非ウイルスベクターの場合は、非ウイルスDNAが関与するので、ここでは基本的に“むき出しの(bare)”DNAが細胞内へ導入され得る。しかし、好ましくはそのような核酸分子はいわゆるリポソーム又はリポプレックス(lipoplexes)中に内包され、そしてこの形態で生物体及び細胞内へ導入される。ウイルスベクターは専門家に知られたある欠点を有するので、非ウイルスベクター又はリポプレックスの使用は基本的に好ましい。本発明の前述の使用可能性の結果として、ここではウイルスベクターを使用せずに操作を行うことがしばしば可能である。何故なら、使用される活性成分の有効性が非常に高く、かつそれに対応して低濃度で操作を行うことが可能だからである。

【0020】

本発明において、使用される活性成分は治療効果のある活性量で好ましくは用いられる。通常的手法において、これは被験者の治療(subject undergoing treatment)に適合することができ、かつとりわけ生理学的添加剤を使用し得る。更なる態様に従って、使用される活性成分及びそれに対応して本発明による方法もまた、局所適用のために提供され得る。これは、全身適用の可能な欠点を回避することを可能にする。本発明による方法の目的とする位置、即ち内耳は、局所適用に特に適している。そのため、この場合には、活性成分は哺乳動物、特にヒトの内耳のいわゆる外リンパ空間(perilymphatic space)内へ導入され得る。これは、中耳からの、例えば円形窓の膜を介しての治療的介入(intervention)の影響を受けやすい、非常に遅い交換率を有する小型液体空間である。この外リンパ空間は、およそ20マイクロリットルのみの容量を有し、そして更に皮質器官の細胞と直接接触する。このことは、その毛髪細胞及び支持細胞を有する知覚上皮上の活性成分の直接的な作用を保証する。

【0021】

本発明は、その使用法が上記の方法において詳細に説明されている実際の活性

成分にも関する。請求項22～27の内容及び表現が参照される。この活性成分は、内耳の知覚細胞、特に内耳の毛髪知覚細胞の再生に対するものであり、そして内耳中に存在するいわゆる細胞周期阻害剤の阻害作用を少なくとも部分的に阻害し、又は排除することができる。細胞周期阻害剤は、好ましくはサイクリン依存性キナーゼ阻害剤、特にサイクリン依存性キナーゼ阻害剤 p27^{Kip1} である。活性成分の特異的な、好ましい特徴に関する上述の記載が参照される。上述のように、それは少なくとも1つのペプチド／蛋白質又は少なくとも1つの核酸分子であることができ、後者は好ましくはアンチセンスDNA若しくはアンチセンスRNAであり、又は活性成分として使用できる対応するペプチド／蛋白質を好ましくはコードする。核酸分子は、DNA分子、cDNA分子又はRNA分子であり得る。特に、核酸分子は適当なベクター又はビヒクルを利用して生物体又は細胞内へ導入され、そしてこれらは上記ウイルス若しくは非ウイルスベクター、又はリポソーム／リポプレックスに内包された核酸分子であり得る。

【0022】

本発明は、最終的に、内耳中に存在する細胞周期阻害剤の作用を阻害し、又は排除することが可能な少なくとも1つの活性成分を活性量で含有し、及び通常のように薬学的に適用可能なキャリアー又は支持体を含有する薬学的組成物又は薬剤に関する。この組成物又は薬剤に含まれる活性成分に関して、上述の記載並びに請求項28及び29の内容が参照される。

【0023】

本発明の記載された特徴及び更なる特徴は、サブクレーム、実施例及び図と共に、好ましい態様の以下の説明から知ることができる。個々の特徴は、独立にも、サブコンビネーションの組み合わせの形でも実施することができる。

【0024】

図1は、いわゆる p27^{Kip1} ノックアウトマウスの皮質器官の知覚上皮における核分裂中の細胞の電子顕微鏡写真である。

【0025】

実施例

試験のために、いわゆる p27^{Kip1} ノックアウトマウス (p27^{-/-})、蛋

白質 p 27^{Kip1}を発現するための遺伝子が欠乏したマウスを使用した。そのため、このようなマウスにおいて、p 27^{Kip1}は、それ自体がその細胞周期阻害作用を発揮することができない。

【0026】

皮質器官は、出生から7日目（出生後7日）のそのような p 27^{Kip1}ノックダウンマウスから除去され、そして皮質器官の知覚上皮を観察可能にする電子顕微鏡試験のために通常の方法で調製される。

【0027】

電子顕微鏡試験の結果を図1に示す。この電子顕微鏡写真は、核分裂（細胞分裂）中の細胞、即ち細胞分裂細胞が、左手、上方又は右手、下方の2つの内部毛髪細胞の間に位置している。この黒く縁取りされた核は、左手上部（完全なもの）及び右手底部（一部分）にある。細胞分裂は、濃縮されたクロマチン(chromatin)、溶解された核膜及び基底小体(basal body)においてははっきりと見ることができる。左手上部の内部毛髪細胞及び基底小体には、理解を容易にするために図中に英語で説明が加えられている。

【0028】

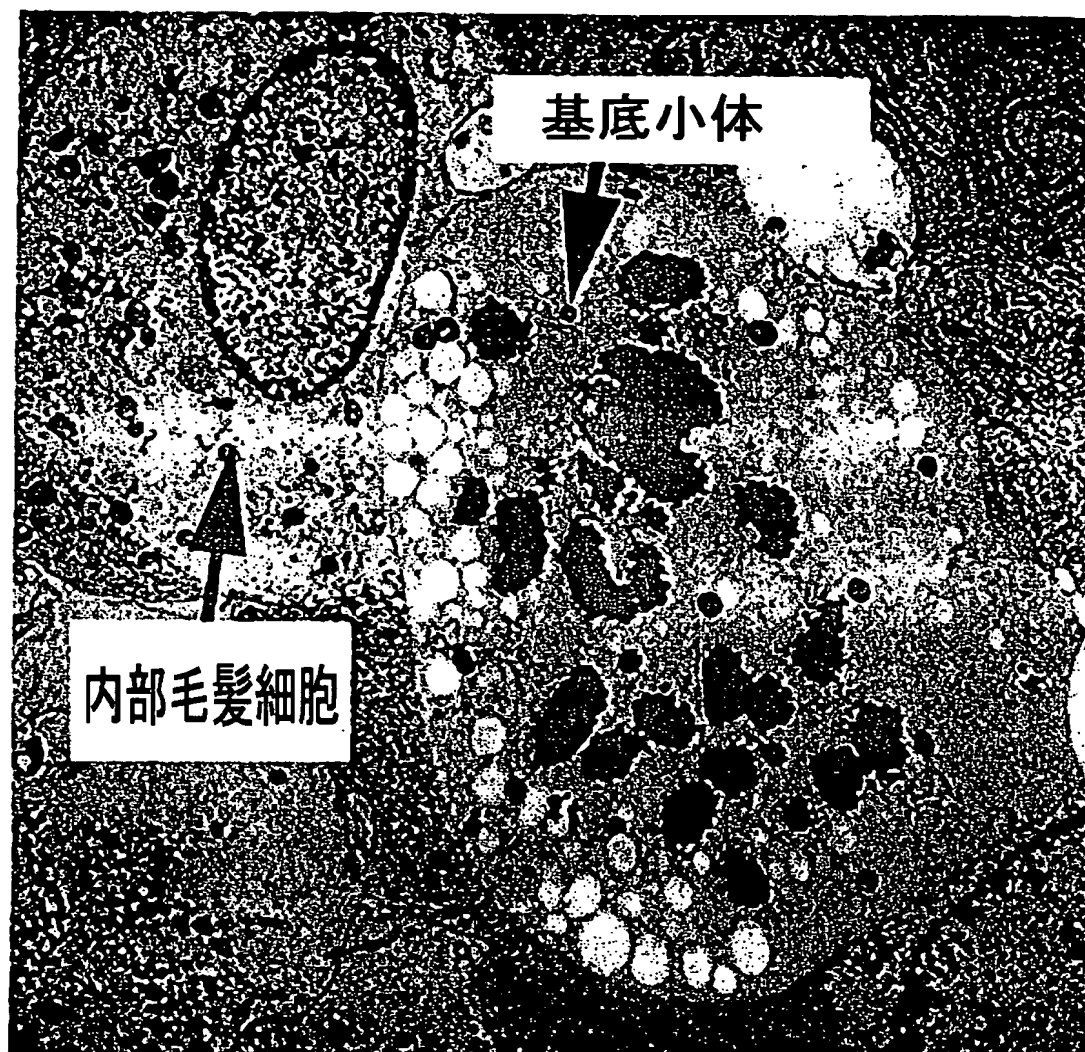
図1は、細胞周期阻害剤 p 27^{Kip1}の欠乏は、マウスの皮質器官の知覚上皮中に局在する支持細胞の細胞分裂の可能性をもたらすことをはっきり示している。図1に示される細胞分裂の場合に、それは皮質器官の知覚上皮内でのみ起こる現象ではなく、むしろここで細胞分裂に付され、そしてその結果細胞周期が行われる多数の細胞内で起こるという事でもある。図1に示された現象は、細胞分裂だけでなく、毛髪細胞再生方法における決定的な段階を表す、後続の細胞分裂、更に毛髪知覚細胞への分化又は成熟、そして最終的には知覚器官の聴覚機能の機能的回復が存在することを結論付けることを可能にする。そのため、知覚細胞の再生が可能である。この結論は、ノックダウンマウスでは単一細胞分裂は起こらないが、にもかかわらずそのようなノックダウンマウスが、蛋白質 p 27^{Kip1}が発現される通常のマウスよりもより多くの毛髪細胞を有するという事実によって支持される。そのため、支持細胞の細胞分裂もまた、結果として成熟した知覚細胞をもたらす。ヘテロの(heterozygous)ノックダウンマウスの場合は、毛髪細胞の

再生により、動物が聴覚機能を発達させる (evolve) 動物の生後第2週 (the second week of living) において、毛髪細胞がアミカシン (amikacin) の全身投与によって破壊されることが証明された。何ら注入せずに更に2週後、動物は殺され、そしてそれらの蝸牛が試験された。これにより、例えばアミカシンと共に投与された増殖マーカー又はラベル (プロモデオキシウリジン-BrdU) によってマークされ、又はラベルされた、蝸牛中で再生された毛髪細胞が明らかになった。

【0029】

そのため、 $p27^{KIP1}$ のための遺伝子が最初から欠如していたノックダウンマウスにおいてだけでなく、通常の生物体において発現される $p27^{KIP1}$ を阻害し、又は排除することによっても、例えば、 $p27^{KIP1}$ 若しくはその生理学的パートナーの1つとのペプチド相互作用を利用して、このペプチドをコードする核酸配列を利用して、又はアンチセンスDNA/アンチセンスRNAを利用して、知覚細胞の再生を引き起こすことができる。ヘテロなマウスの場合に遺伝子投与依存性効果が観察されるので、これは $p27^{KIP1}$ の機能の一部の排除のみによっても起こり得る。

【図1】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No
PCT/EP 99/01153

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K38/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO 98 13048 A (NAVARATNAN DHASAKUMAR S ; UNIV PENNSYLVANIA (US); OBERHOLTZER J CAR) 2 April 1998 (1998-04-02) abstract page 2, line 10 -page 4, line 23 page 6, line 24-30 page 7, line 16 -page 8, line 22; claims 1-20; examples 1-4 --- -/-	1-6, 8, 10, 20-23, 28, 29

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 December 1999

Date of mailing of the international search report

20/12/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5015 Patentstr. 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

A. Jakobs

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Intern. of Application No
 PCT/EP 99/01153

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	CHEN, P. ET AL: "p27/Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor, is required for the normal development of the mouse auditory sense organ." SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, (1998) VOL. 24, NO. 1-2, PP. 809. MEETING INFO.: 28TH ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, PART 1 LOS ANGELES, CALIFORNIA, USA NOVEMBER 7-12, 1998 SOCIETY FOR NEUROSCIENCE., XP002123936 abstract ---	1-29
X	WO 98 00014 A (LALWANI ANIL ;UNIV CALIFORNIA (US); SCHINDLER ROBERT A (US)) 8 January 1998 (1998-01-08) the whole document ---	1-29
X	WO 97 22255 A (DANA FARBER CANCER INST INC ;SHIN JAEKYOUN (US); JOUNG INSIL (US);) 26 June 1997 (1997-06-26) page 20, line 3-28 page 53, line 4-22 ---	22-25
X	SCHWEITZER V G: "Cisplatin-induced ototoxicity: the effect of pigmentation and inhibitory agents." LARYNGOSCOPE, (1993 APR) 103 (4 PT 2) 1-52. REF: 151, XP002123937 abstract ---	1-6, 8, 10, 20-23, 28, 29
X	UMEMOTO M ET AL: "HAIR CELL REGENERATION IN THE CHICK INNER EAR FOLLOWING ACOUSTIC TRAUMA: ULTRASTRUCTURAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES" CELL AND TISSUE RESEARCH, DE, BERLIN, vol. 3, page 435-443 XP002060017 page 441, column 1, paragraph 7 -page 442, column 2, paragraph 2 ---	1-6, 8-10, 20-25
X	WO 97 17983 A (CAMBRIDGE NEUROSCIENCE INC ;UNIV VIRGINIA (US); E K SHRIVER CENTER) 22 May 1997 (1997-05-22) abstract page 6, line 1 -page 7, line 8 page 10, line 12 -page 12, line 9 page 16, line 27 -page 17, line 9 page 18, line 1 -page 31, line 20; claims 1-28; examples 1-6 ---	1-29
A	BUJIA J. ET AL: "Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in middle ear cholesteatoma." EUROPEAN ARCHIVES OF OTO-RHINO-LARYNGOLOGY, (1996) 253/1-2 (21-24)., XP002123938 ---	1-29

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.
PCT/EP 99/01153

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YAMAGUCHI T ET AL: "The effect of chalone on the cell cycle in the epidermis during wound healing." EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, (1974 DEC) 89 (2) 247-54. , XP002123939 the whole document	1-29
X,P	WO 99 06064 A (AMGEN INC) 11 February 1999 (1999-02-11) abstract page 9, line 20 -page 11, line 10 page 12, line 1 -page 53, line 9; claims 1-40; examples 1-4	1-29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 99/01153

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1, 4-21
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although Claims 1, 4-21 relate to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

2. ☒ Claims Nos.: -
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See supplemental sheet Additional Matter PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP99/01153

Continuation of Box I.2

Patent claims 1-29 relate to a product/utilization which are defined (inter alia) by the following parameters:

P1: active substance inhibiting or suppressing the effectiveness of at least one cell cycle inhibitor

P2: active substance inhibiting or suppressing the effectiveness of at least the cell cycle inhibitor cyclin-dependent kinase inhibitor

P3: active substance inhibiting or suppressing the effectiveness of at least the cell-cycle inhibitor cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kipl.

In the present context, the use of said parameter appears to be lacking in clarity as defined by PCT Art. 6. It is impossible to compare the parameter chosen by the applicant with relevant disclosures in prior art. The lack of clarity is such that no meaningful search is deemed possible. It is indicated in page 9 of the description that the active substance may be selected or developed for instance by choosing a binding site between p27Kipl and cyclin A or p27Kipl and CDK2 in which no binding/interaction with high or very high affinity is present in order to select or develop said active substance, preferably in the form of an additional peptide/protein in such a way that binding/interaction is achieved with one of both interaction partners on the corresponding binding site with at least the same high or preferably higher affinity so as to obtain the physiological effect (treatment of diseases and disorders of the inner ear). A more detailed technical solution or structural transcription of the active substance(s) for which patent protection is sought in claims 1-29 is not provided. Moreover, the International Searching Authority is of the opinion that it is not the task of the public to select or develop the active substances covered by the protection sought for by the present application. For this reason, the search was limited to the examples/compounds and to the compounds which possibly solve the present task and wherever possible to the alleged mode of action indicated in the patent claims.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP99/01153

The applicant's attention is drawn to the fact that patent claims, or parts of patent claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective whether or not the patent claims are amended following receipt of the International Search Report (PCT Art. 19) or whether or not the applicant files new patent claims during any PCT Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/EP 99/01153

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9813048	A	02-04-1998	AU	4600297 A	17-04-1998
WO 9800014	A	08-01-1998	AU	3591597 A	21-01-1998
WO 9722255	A	26-06-1997	US	5962224 A	05-10-1999
			AU	1291197 A	14-07-1997
WO 9717983	A	22-05-1997	AU	7725896 A	05-06-1997
			EP	0866716 A	30-09-1998
WO 9906064	A	11-02-1999	AU	8658298 A	22-02-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	識別記号	F I	ターム(参考)
A 61 K 38/00		A 61 K 48/00	
38/55		A 61 P 27/16	
48/00		43/00	1 0 5
A 61 P 27/16		A 61 K 37/02	
43/00	1 0 5	37/64	
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, B J, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, D K, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, L T, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, U A, UG, US, UZ, VN, YU, ZW		
Fターム(参考)	4C076 AA19 CC29 FF63		
	4C084 AA02 AA06 BA44 NA14 ZA342		
	ZC022		
	4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA03		
	MA05 MA24 NA03 NA14 ZA34		
	ZC02		
	4C087 AA01 AA02 BC83 NA14 ZA34		
	ZC02		